

Viabilidad y germinación *in vitro* de semillas de *Passiflora quimbayensis* Ocampo & Forero y *Passiflora ligularis* Juss. como estrategia para la conservación de especies nativas de Colombia

Viability and *in vitro* germination of seeds of *Passiflora quimbayensis* Ocampo & Forero and *Passiflora. ligularis* Juss. seeds as a strategy for the conservation of native species of Colombia

Lina Marcela Parrado Palma ^{1,3}, John Albeiro Ocampo Pérez   ^{1,4}, Roosevelt Humberto Escobar Pérez  ^{2,5}.

¹Universidad Nacional de Colombia - Sede Palmira. Palmira, Colombia. ²Alianza Bioversity International - Centro Internacional de Agricultura Tropical CIAT. Palmira. Colombia. ³  lparrado@unal.edu.co; ⁴  jaocampop@unal.edu.co; ⁵  r.escobar@cgiar.org



<https://doi.org/10.15446/acag.v73n2.112163>

2024 | 73-2 p 190-200 | ISSN 0120-2812 | e-ISSN 2323-0118 | Rec.: 2023-12-18 Acep.: 2025-06-13

Resumen

Colombia es el país con mayor diversidad de especies del género *Passiflora* L., tanto silvestres como cultivadas. Sin embargo, esta riqueza se ve amenazada por múltiples acciones antrópicas y la falta de estrategias para la conservación de estos recursos biológicos. Por tal razón, el objetivo de esta investigación fue estudiar la viabilidad y germinación *in vitro* en semillas de 2 especies colombianas del género *Passiflora* L. (*P. quimbayensis* y *P. ligularis*). La metodología fue establecida por medio de una prueba de viabilidad de las semillas (tetrazolio), una siembra en vivero y técnicas de micropagación: (1) obtención del material vegetal, (2) establecimiento aséptico del cultivo y (3) multiplicación del material vegetal. Un diseño experimental completamente al azar con 3 tratamientos por 3 repeticiones y 1 muestra de 33 unidades experimentales por cada tratamiento fueron analizados con el programa R-Studio. Los resultados mostraron que las semillas obtuvieron entre el 80-95 % de viabilidad. En la siembra en vivero, *P. ligularis* presentó un porcentaje de germinación del 70 % de germinación a los 11 días, mientras que *P. quimbayensis* solo alcanzó el 3 % de germinación a los 60 días. En el protocolo de conservación *in vitro*, el mejor tratamiento de asepsia (T1) con hipoclorito de sodio al 6 % mostró la menor contaminación por patógenos (<25 %). El despuente apical de las semillas mostró los mayores porcentajes de germinación, con 99 % y 100 % en *P. quimbayensis* y *P. ligularis*, respectivamente. El método de cultivo *in vitro* permitió la regeneración de las semillas de *P. quimbayensis*, aunque en las raíces hubo formación de callo, mientras que en *P. ligularis* el enraizamiento fue normal, sin presencia de callo. El método de conservación *in vitro* mostró resultados positivos para la propagación de *P. ligularis*, mientras que requiere ajustes para su aplicación en especies silvestres como *P. quimbayensis*.

Palabras clave: conservación, cultivo de tejidos, escarificación, Passifloraceae, semillas.

Abstract

Colombia is the country with the greatest diversity of *Passiflora* L. species, both wild and cultivated. However, this richness threatened by several anthropic actions, as well as the lack of strategies to preserve these biological resources. For that reason, the objective of this research was to evaluate the viability and *in vitro* germination of two seed species from the genus *Passiflora* L. (*P. quimbayensis* and *P. ligularis*) distributed in Colombia. The methodology included a seed viability test using tetrazolium, nursery sowing, and micropagation techniques, which involved three stages: (1) obtaining plant material, (2) aseptic establishment of the culture, and (3) plant material multiplication. A completely randomized experimental design was used, consisting of three treatments, each with three replicates and a sample of 33 experimental units for each treatment. Data were analyzed using the R-Studio program. The results indicated seeds viability ranging from 80 % to 95 %. In the nursery sowing trials, *P. ligularis* exhibited a 70 % germination rate at 11 days, whereas *P. quimbayensis* reached only a 3 % germination rate after 60 days. In the *in vitro* conservation protocol, the most effective aseptic treatment (T1), with 6 % sodium hypochlorite, resulted in the lowest level of contamination by pathogens (less than 25 %). Apical seed sprouting exhibited the highest germination rates, with 99 % in *P. quimbayensis* and 100 % in *P. ligularis*. The *in vitro* culture method enabled the generation of *P. quimbayensis* seeds, although callus formation was observed on the roots. In contrast, *P. ligularis* exhibited normal rooting without callus development. The *in vitro* conservation method showed positive results for propagation of the *P. ligularis*; however, it requires further adjustments for effective application in wild species such as *P. quimbayensis*.

Keywords: Conservation, Passifloraceae, scarification, seeds, tissue culture.

Introducción

El género *Passiflora* L. es considerado como un indicador de la biodiversidad en Colombia, cuyas especies presentan múltiples interacciones ecológicas con otros organismos (Ocampo et al., 2021). Colombia, en las últimas décadas, ha experimentado una transformación de grandes áreas de sus ecosistemas naturales, debido a múltiples actividades antrópicas. Por tal razón, esfuerzos de conservación o restauración de los hábitats naturales son estrategias que deben integrarse para el mantenimiento de la diversidad de *Passiflora* en Colombia (Pacheco et al., 2016). A pesar de esta problemática, existe poca información relacionada con la conservación de los recursos genéticos de *Passiflora* en bancos de germoplasma (Ocampo et al., 2021). Adicionalmente, la longevidad de las semillas de *Passiflora* varía de manera importante entre sus especies, debido a las diferencias de genotipo y origen (Hong y Ellis, 1996). En estudios previos sobre las principales especies cultivadas de *Passiflora* (maracuyá, granadilla y gulupa), las semillas mostraron un comportamiento ortodoxo e intermedio en almacenamiento (Posada et al., 2014). Por otro lado, a nivel global existen alrededor de 50 colecciones de *Passiflora* y el número de accesiones va en aumento en los últimos años, pues ha pasado de 524 en 1994, a 2274 en la actualidad (CerdeiraSilva et al., 2012; Ocampo et al. 2021).

Por lo anterior, es fundamental conocer el potencial germinativo de las semillas conservadas en los bancos de germoplasma (Junghans et al., 2021). Igualmente, es importante tener en cuenta que uno de los obstáculos en las especies de *Passiflora* es la baja capacidad germinativa de las semillas, lo cual está relacionado por poseer una testa dura y lignificada de la cubierta seminal (Bewley y Black, 1982; Pérez et al., 2022; Rodríguez et al., 2020). Estas características de la semilla generan una latencia exógena mecánica, lo que dificulta una normal germinación, por lo que es necesario buscar alternativas para romper la latencia.

Las investigaciones en *Passiflora* spp. relacionadas con la conservación de semillas son escasas. Estos estudios se han enfocado en el manejo de diferentes tratamientos pregerminativos para romper mecanismos de latencia fisiológica y física de las semillas, como la alternancia de temperaturas, el manejo de diferentes concentraciones de ácido giberélico (AG₃), la escarificación en condiciones de laboratorio y en vivero, y la evaluación de la capacidad germinativa con tetrazolio (Rodríguez et al., 2020). Así, existen investigaciones en las que la aplicación de AG₃ en diferentes concentraciones en semillas de *P. tripartita* var. *mollissima* (Kunth) Holm-Niels. & *P. Jørg.* (Cardozo, 1988), *P. nitida* Kunth (Passos et al., 2004), *P. alata* Curtis (Junghans et al., 2021), *P. edulis* f. *flavicarpa* Degener (Lima et al., 2009) y *P. ligularis* Juss. (Gutiérrez et al., 2011) promovió considerablemente la germinación. De la misma manera, el uso de

tratamientos pregerminativos como la escarificación y la inmersión de la semilla en especies como *P. tricuspidata* Mast. (Delanoy et al., 2006), *P. caerulea* L. (Mendiondo y García, 2009), *P. cincinnata* Mast. (Júnior et al., 2010) y *P. edulis* f. *flavicarpa* (De Oliveira et al., 2023) han logrado favorecer la absorción del agua y romper la latencia que se presenta en muchas especies de *Passiflora*. Otro estudio realizado por Balaguera et al. (2010) con la escarificación en frío (4 °C) y cubrimiento de la semilla de *P. edulis* Sims f. *edulis* también mostró un incremento significativo en los porcentajes de germinación, lo cual sugiere que esta técnica puede ser efectiva para superar la latencia y mejorar la emergencia de plántulas.

En la actualidad, las técnicas de propagación *in vitro* permiten mejores porcentajes de germinación de semillas (Junghans et al., 2021), las cuales pueden ser implementadas para mantener la conservación de la diversidad genética o en múltiples aplicaciones en programas de fitomejoramiento (Faleiro et al., 2019; Mohammadi et al., 2023). Estudios de propagación *in vitro* para la conservación de semillas, han sido desarrollados en diferentes especies, como *P. alata* (Junghans et al., 2021), *P. caerulea* (Severin et al., 2004; Taylor et al., 2004), *P. cumbalensis* (Karst.) y *P. tripartita* var. *mollissima* Holm-Niels. & Jorg. (Córdoba et al., 2010) y por Castrillón et al. (2024) en *P. maliformis* con resultados variables en la producción de plántulas. En Colombia, investigaciones realizadas para la conservación de especies silvestres, en el Jardín Botánico de Bogotá - José Celestino Mutis, han utilizado la técnica de cultivo de tejidos vegetales para la micropropagación de semillas en *P. cumbalensis* (Gonzales, 2004).

El presente trabajo surge como iniciativa del Grupo de Investigación en Recursos Fitogenéticos (GIRFIN) por conservar especies nativas o endémicas en Colombia, que actualmente se encuentran amenazadas (peligro crítico - CR) y cuyo hábitat está disturbado o destruido (Ocampo et al., 2021; Caleño-Ruiz et al., 2024). Así, La aplicación de técnicas de cultivo *in vitro* puede mejorar significativamente la viabilidad y la germinación de las semillas de *Passiflora quimbayensis* y *P. ligularis*, contribuyendo al establecimiento de estrategias efectivas para su conservación. Por lo tanto, esta investigación tiene como objetivo estudiar la viabilidad y la germinación *in vitro* en semillas de 2 especies colombianas del género *Passiflora* (*P. quimbayensis* Ocampo & Forero, y *P. ligularis* Juss.) que permitan su conservación *ex situ*.

Materiales y métodos

Área de estudio

La investigación se realizó en el laboratorio de cultivo de tejidos y en la casa de malla de la Universidad Nacional de Colombia - Sede Palmira, localizada en el municipio de Palmira (Valle del Cauca) a 980 m s. n. m. (3°30'44.58"N, 76°18'29.14"W).

Especies estudiadas

Semillas de 2 especies del género *Passiflora*, representadas en los subgéneros *Decaloba* (*P. quimbayensis*) y *Passiflora* (*P. ligularis*) provenientes de la colección de semillas de la Universidad Nacional de Colombia - Sede Palmira y conservadas en frío (7-8 °C) y entre 70-75 % de humedad relativa, fueron empleadas en este estudio.

Preparación de la semilla

Las semillas de cada especie pasaron por una inmersión en agua destilada durante 4 días para luego retirar los residuos del arilo y la sarcotesta. Posteriormente, las semillas fueron lavadas con agua estéril retirando los residuos existentes y secadas en papel absorbente durante 48 horas a temperatura ambiente.

Prueba de viabilidad

La evaluación de la viabilidad de las semillas se realizó mediante la prueba de tetrazolio, siguiendo el protocolo propuesto por la Association of Official Seed Analysts/Society of Commercial Seed Technologists (Miller y Peters, 2010). El procedimiento incluyó una etapa de preacondicionamiento, consistente en la imbibición de las semillas en agua destilada durante 24 horas a una temperatura constante de 30 °C. Posteriormente, se procedió a la escarificación de las semillas mediante un corte longitudinal en la testa, con el fin de exponer el embrión. Las semillas escarificadas fueron puestas en una solución al 1 % de cloruro de 2,3,5-trifenil tetrazolio bajo condiciones de oscuridad, durante un periodo de 24 horas a 30 °C. Para cada especie evaluada se establecieron 3

repeticiones experimentales, utilizando 10 semillas por repetición. Los porcentajes de viabilidad se determinaron a partir del número de embriones que presentaron tinción uniforme, de acuerdo con los criterios establecidos por Miller y Peters (2010).

Siembra en vivero

Las semillas antes de la siembra fueron sometidas a un tratamiento de escarificación mecánica mediante despuente apical, seguido por la inmersión en una solución de nitrato de potasio (KNO_3) al 1 % durante 24 horas a temperatura ambiente. Finalizado este periodo, la solución fue filtrada para eliminar residuos, y las semillas fueron puestas sobre papel absorbente para eliminar el exceso de humedad superficial.

La siembra se realizó en bandejas plásticas de 20 cm de altura, utilizando como medio de cultivo una mezcla de sustrato comercial compuesto por fibra de coco y turba en una proporción 2:1. Las semillas fueron sembradas a una profundidad de 0.5 cm. El riego fue realizado diariamente con agua potable. Las evaluaciones de germinación se realizaron semanalmente durante un periodo de 60 días.

El ensayo fue conducido bajo un diseño completamente aleatorizado, con 3 repeticiones por especie y 10 semillas por repetición. Como variable de respuesta se consideró el porcentaje de germinación (% PG), calculado al final del periodo de evaluación.

Cultivo in vitro

Etapa 0. Obtención del material vegetal

Las semillas empleadas de cada especie para la fase experimental del cultivo in vitro fueron seleccionadas de las mismas accesiones del mismo lote, las cuales presentaron viabilidad con la prueba de tetrazolio (Figura 1) y la germinación en la fase de vivero.

Etapa I. Establecimiento aséptico del cultivo

Las semillas de cada especie fueron inicialmente lavadas con agua estéril para eliminar los residuos del arilo y la sarcotesta. A continuación, se sumergieron durante 20 minutos en una solución

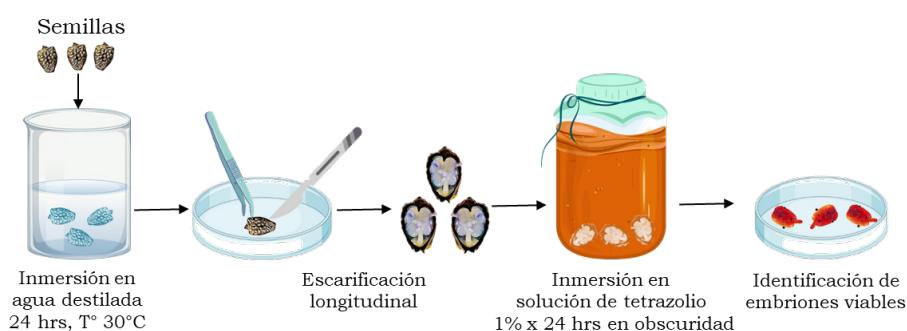


Figura 1. Protocolo de la prueba de viabilidad de acuerdo a la metodología propuesta por Miller y Peters (2010).

compuesta por detergente alcalino al 3 % y ácido ascórbico a una concentración de 100 mg l⁻¹ como agente antioxidante. Posteriormente, se realizó un enjuague con agua destilada estéril para remover los residuos del detergente. Luego las semillas fueron desinfectadas superficialmente mediante inmersión en etanol al 70 % durante 30 segundos. Tras este paso, se aplicaron 2 tratamientos de desinfección utilizando soluciones de hipoclorito de sodio (NaOCl) al 6 % y 7 %, respectivamente, durante 20 minutos. Finalizado el tratamiento, las semillas fueron enjuagadas 3 veces con agua destilada estéril, con intervalos de 2, 5 y 10 minutos, con el fin de eliminar completamente los residuos del agente desinfectante.

El experimento fue establecido bajo un diseño completamente aleatorizado con 2 tratamientos, 3 repeticiones por tratamiento y 10 semillas por unidad experimental para cada una de las especies evaluadas.

Etapa II. Multiplicación del material vegetal

Para la inducción de germinación in vitro de las semillas de las *Passiflora* estudiadas, fue utilizado el medio de Murashige y Skoog (MS), el cual fue suplementado con sacarosa en una preparación de 30 g/l, agar 7 g/l, tiamina 7 g/l. A este medio de cultivo fue adicionado ácido giberélico (AG₃), como regulador de crecimiento, en una concentración de

2 mg/l (Roca y Mroginski, 1997). El pH del medio fue ajustado a 5.8 antes de la esterilización, la cual fue realizada mediante autoclave a 120 °C y una presión de 15 psi durante 25 minutos.

Debido a la dureza y a las características morfoanatómicas de la testa en las semillas del género *Passiflora*, fueron empleados tratamientos pregerminativos para favorecer la germinación in vitro. Previo a la escarificación, las semillas de ambas especies fueron sometidas a un tratamiento de imbibición en ácido giberélico (AG₃) durante 24 horas (Figura 2). El experimento se estableció bajo un diseño completamente al azar, con 3 tratamientos de escarificación: T1 (sin escarificación), T2 (escarificación total) y T3 (escarificación por despunte apical). Cada tratamiento fue evaluado con 3 repeticiones y 1 unidad experimental de 33 semillas para un total de 99 semillas por tratamiento y especie. Las semillas tratadas fueron sembradas en frascos de vidrio estériles de 100 ml, cada uno con 20 ml de medio de cultivo MS. Los frascos fueron transferidos a una cámara de cultivo de incubación con condiciones controladas de temperatura (24 °C) y un fotoperíodo de 16 horas luz por 8 horas oscuridad (Roca y Mroginski, 1997). La evaluación de la germinación fue realizada cada 7 días durante un periodo total de 14 semanas.

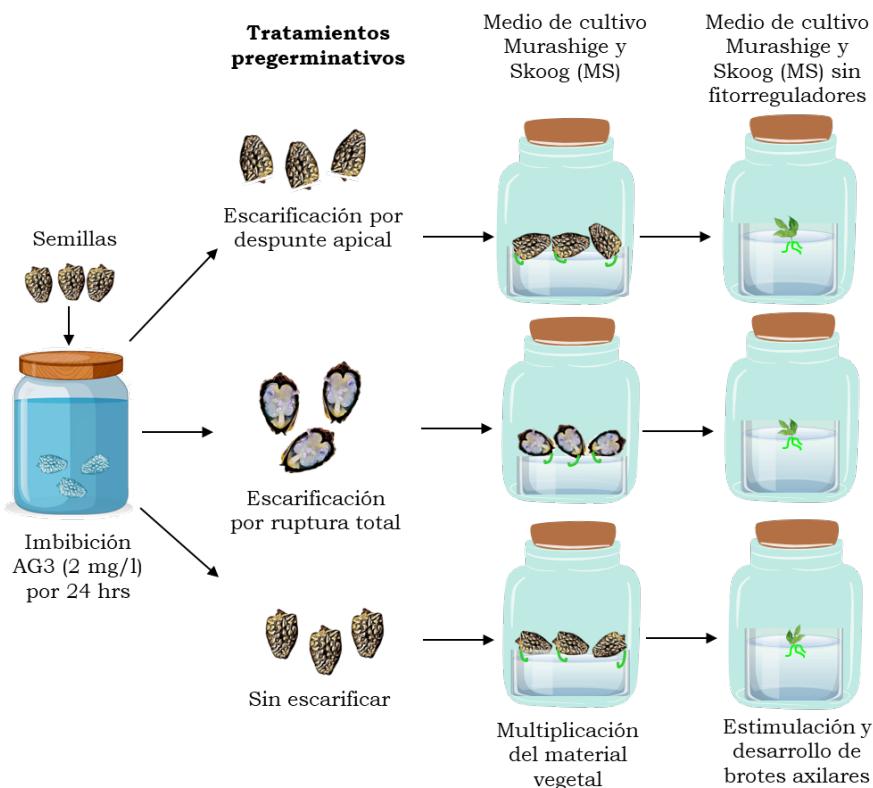


Figura 2. Protocolo de germinación in vitro de la semilla, multiplicación del material vegetal, estimulación y desarrollo de brotes axilares de las *Passiflora* estudiadas.

Etapa III. Estimulación y desarrollo de brotes axilares

Para inducir la formación y el desarrollo de brotes axilares, cada explante fue sometido a un proceso de multiplicación directa a través de la organogénesis adventicia. Posteriormente, las plántulas obtenidas fueron transferidas a un medio de cultivo Murashige y Skoog (MS) libre de fitorreguladores, con el fin de favorecer el desarrollo inicial de las primeras fases de enraizamiento (Figura 2).

Análisis de datos

El análisis de los datos correspondientes a la viabilidad y germinación de semillas en condiciones de invernadero fue basado en los porcentajes obtenidos por cada repetición, considerando el número de semillas germinadas respecto al total sembrado por unidad experimental. Para los ensayos establecidos bajo condiciones *in vitro*, fue empleado un diseño experimental completamente aleatorizado con múltiples tratamientos por especie. Los datos fueron sometidos a un análisis de varianza (ANDEVA) con el fin de identificar diferencias significativas entre tratamientos. Previo a la comparación de medias, fue aplicada la prueba de Levene para verificar la homogeneidad de las varianzas. En los casos en que se cumplió este supuesto, se procedió con una prueba de comparación de medias mediante Tukey con un nivel de significancia de $p \leq 0.05$. Los datos fueron inicialmente organizados y tabulados en Microsoft Excel 2011, y posteriormente procesados y analizados en el entorno estadístico RStudio (versión 4.x), utilizando el paquete Reporttools para la validación de supuestos y la generación de estadísticas descriptivas.

Resultados y discusión

Prueba de viabilidad

En las semillas de las *Passiflora* estudiadas se observó la presencia de un embrión de forma espatulada con endospermo blanquecino y con variaciones en el tamaño entre las especies comparadas (Figura 3).

La prueba de viabilidad mediante tetrazolio (Miller y Peters, 2010) mostró resultados elevados en ambas especies. La especie silvestre *Passiflora quimbayensis* registró un 96 % de viabilidad, evidenciado por la tinción uniforme de la mayoría de sus embriones. Por su parte, en *P. ligularis* (granadilla) presentó un 100 % de viabilidad, con embriones completamente teñidos, lo que indicó integridad fisiológica y metabólica (Figura 4).

Estos resultados son consistentes con estudios previos en otras especies del género *Passiflora*. Así, en *P. foetida* se logró una tinción homogénea mediante la aplicación de una solución de tetrazolio al 1 % durante

2 horas a 30 °C, lo cual permitió una evaluación eficaz de la viabilidad (Costa et al., 2016). De manera similar, en *P. elegans* Mast. la exposición a una concentración de 0.05 % de tetrazolio a 36 °C durante 24 horas generó resultados positivos en la detección de embriones viables (Da Silva et al., 2019). En *P. edulis* f. *edulis* y *P. ligularis*, Aguacía et al. (2015) reportaron una coloración uniforme y clara del tejido embrionario utilizando una concentración de tetrazolio del 0.5 % a 32 °C durante 24 horas, lo cual confirma la eficacia del método en estas especies. No obstante, la prueba de viabilidad por tinción no constituye una garantía para obtener altos porcentajes de germinación, debido a que diversas especies de *Passiflora*, como *P. edulis* (maracuyá), *P. ligularis* (granadilla), *P. maliformis* L. (cholupa), *P. quadrangularis* L. (badea) y *P. edulis* f. *edulis* (gulupa), se ha documentado la presencia de latencia exógena (Ellis et al., 1985; Rodríguez et al., 2020). Esta condición fisiológica, asociada principalmente a la dureza de la testa, limita la capacidad de germinación, incluso, en semillas viables (Ellis et al., 1985).

Por otro lado, el grado de domesticación de las especies puede influir significativamente en la capacidad de germinación de las semillas. En este estudio se observó que la especie cultivada de granadilla (*P. ligularis*) presentó un 100 % de embriones viables, en contraste con la especie silvestre evaluada. Lo anterior sugiere una posible relación entre el estado de domesticación y la viabilidad embrionaria, lo cual ha sido documentado en *P. edulis* f. *edulis* (Rodríguez et al., 2020).

Adicionalmente, la correcta interpretación de la prueba de tetrazolio depende de diversos factores técnicos que aseguran la precisión del diagnóstico, entre ellos, la adecuada penetración del reactivo en los tejidos, el tipo de corte aplicado a la semilla, el movimiento de la solución, la concentración del cloruro de 2,3,5-trifenil tetrazolio, así como el establecimiento óptimo de temperatura y del tiempo de imbibición. Estos parámetros son fundamentales para garantizar una tinción uniforme y confiable (Vega et al., 2022).

Cultivo en invernadero

Las semillas de *P. quimbayensis* iniciaron el proceso germinativo a los 11 días después de la siembra, y alcanzaron solamente un 3 % de germinación. Este bajo porcentaje sugiere la presencia de mecanismos de latencia relacionados con barreras físicas y químicas en la testa. En contraste, *P. ligularis* alcanzó un 70 % de germinación a los 25 días, con seguimiento continuo hasta los 60 días posteriores a la siembra. El bajo porcentaje de germinación en *P. quimbayensis* es consistente con lo reportado por Posada et al. (2014), quienes describen la presencia de tejidos lignificados y recubrimientos cerosos como factores inhibidores. Por el contrario, el comportamiento observado en *P. ligularis* sugiere un mayor grado de

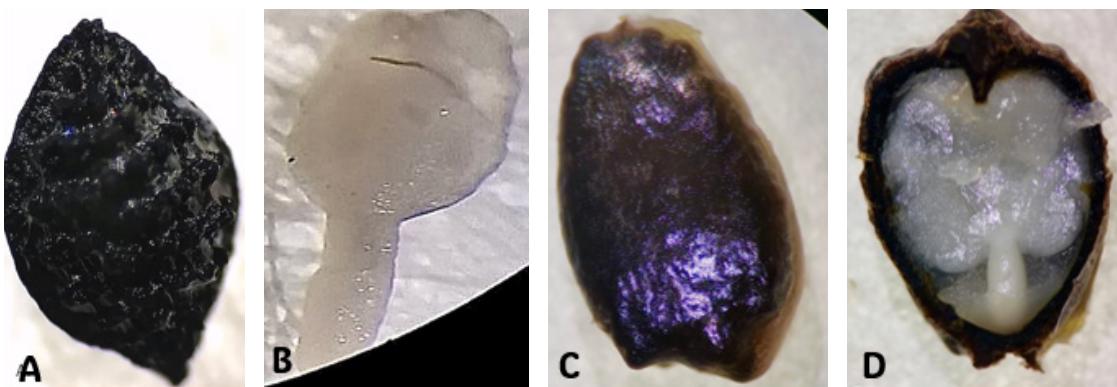


Figura 3. Morfología externa y embrión de la semilla de *P. quimbayensis* (A-B) y *P. ligularis*. (C-D).

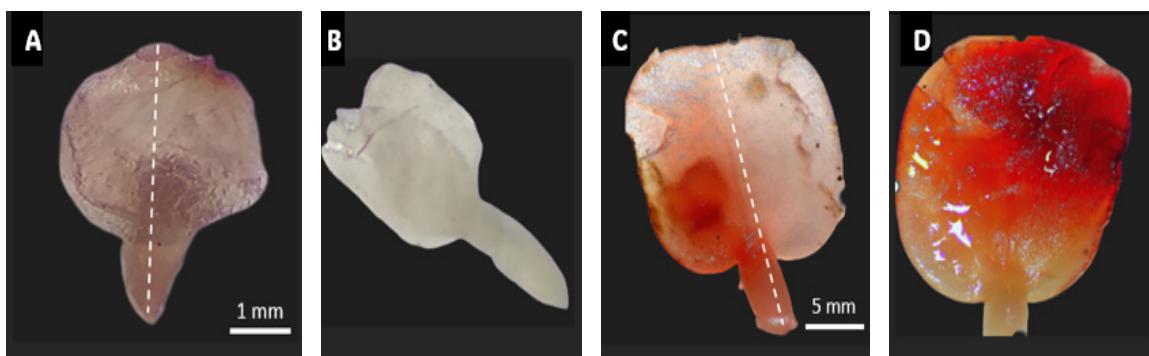


Figura 4. Patrones de coloración de embriones en prueba de viabilidad: (A y B) *P. quimbayensis*; (C y D) *P. ligularis*.

domesticación, lo cual podría haber favorecido una reducción de mecanismos de latencia, como lo han propuesto diversos autores en especies cultivadas. Estos hallazgos refuerzan la hipótesis de que las barreras físicas en la testa constituyen un factor limitante para la germinación en especies silvestres de *Passiflora* y justifica la necesidad de explorar protocolos pregerminativos específicos.

Cultivo *in vitro*

Etapa I. Establecimiento de desinfección del cultivo

Los ensayos preliminares de asepsia realizados en semillas viables de *Passiflora quimbayensis* y *P. ligularis* mostraron diferencias en la efectividad de los tratamientos aplicados. En *P. quimbayensis*, el tratamiento T1 con hipoclorito de sodio (NaOCl) al 6 % no logró prevenir la contaminación, por lo cual registró un 0 % de asepsia, mientras que el tratamiento T2 con NaOCl al 7 % presentó una leve mejora, pues alcanzó un 6.6 % de asepsia. En ambos casos, el contaminante predominante fue de origen bacteriano, presumiblemente introducido durante el proceso de siembra en el medio de cultivo, lo que sugiere una fuente exógena asociada al ambiente o a las condiciones de manipulación (Figura 5). En

contraste, las semillas de *P. ligularis* no presentaron contaminación alguna en ninguno de los tratamientos evaluados, lo cual sugiere una mayor resistencia superficial a agentes contaminantes o una mayor eficacia del protocolo de desinfección para esta especie en particular.

Estos resultados concuerdan parcialmente con lo reportado por Manjarrés y Perea (2012), quienes obtuvieron un 100 % de supervivencia en semillas de *P. edulis* f. *edulis* utilizando un protocolo combinado con solución de Isodine al 3 % y NaOCl al 2 % durante 20 minutos. De igual manera, Gonzales (2004) reportó una eficacia del 97 % en el proceso de asepsia de semillas de *P. tripartita* var. *mollissima* y *P. cumbalensis* empleando NaOCl al 7 % durante el mismo periodo de exposición. En comparación, Castrillón *et al.* (2024) obtuvieron un 77 % de efectividad en la desinfección de semillas de *P. maliformis* con etanol al 70 % y NaClO al 2.5 %, aunque los porcentajes fueron menores, el protocolo permitió una germinación del 100 %.

Para validar la eficacia del protocolo de asepsia propuesto, se realizó un seguimiento semanal a los medios de cultivo, con el objetivo de detectar la presencia de agentes contaminantes, principalmente bacterias y hongos. De acuerdo con los resultados obtenidos, no se evidenció desarrollo microbiano en las unidades experimentales evaluadas, lo que

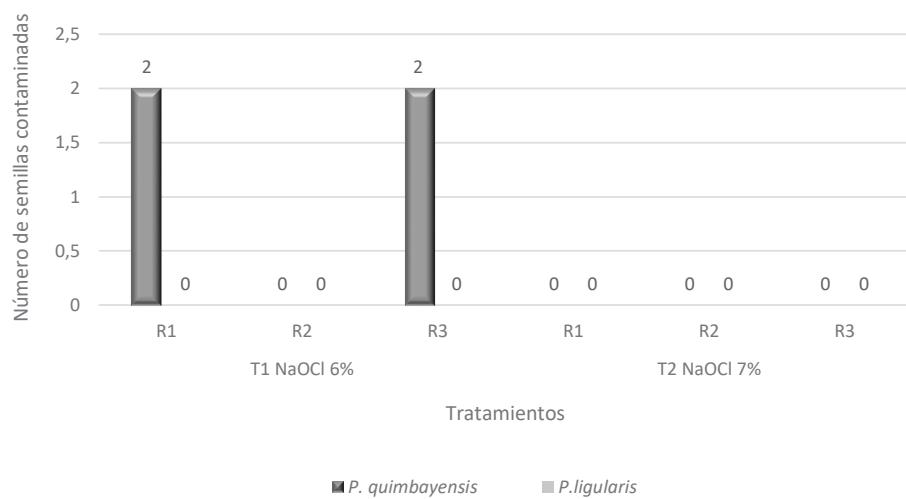


Figura 5. Porcentaje de contaminación vs. tipo de tratamiento de desinfección en cultivo *in vitro* de las semillas.

permite afirmar que el protocolo implementado fue efectivo y eficiente en el control de contaminantes durante las fases iniciales del cultivo *in vitro*.

Es fundamental resaltar que los procesos de desinfección no solo deben eliminar de forma eficaz los microorganismos epífitos o endófitos, sino también preservar la viabilidad fisiológica del explante, para permitir su crecimiento activo y un desarrollo adecuado en las etapas posteriores del cultivo (Junghans *et al.*, 2008; Carvalho *et al.*, 2012). La contaminación microbiana representa uno de los principales obstáculos en la propagación *in vitro*, debido a que los microorganismos pueden competir con los explantes por los nutrientes disponibles en el medio de cultivo o alterar su composición química (Roca y Mroginski, 1997).

En este estudio se observó que la ornamentación externa de las semillas de *P. ligularis* es menos reticulada y presenta una superficie más lisa en comparación con *P. quimbayensis*. Esta característica morfológica podría estar asociada con una menor retención de agentes contaminantes en las estructuras superficiales de la semilla, lo que explicaría la ausencia de contaminación en esta especie durante la evaluación.

El protocolo de asepsia utilizado en este estudio demostró ser adecuado para ambas especies evaluadas; además, fue particularmente eficiente en *P. ligularis*, y constituye una base sólida para el establecimiento exitoso de cultivos *in vitro* en programas de propagación y conservación de germoplasma.

Etapa II. Multiplicación del material vegetal

El resultado del análisis de varianza (ANDEVA) mostró que existe una homogeneidad de las varianzas dentro de los tratamientos, de acuerdo con la prueba de Levene. Los resultados obtenidos evidenciaron diferencias significativas (Tukey $p \leq 0.05$) en la

velocidad y porcentaje de germinación *in vitro* entre los tratamientos aplicados a las semillas de *P. quimbayensis* y *P. ligularis* (Figura 6, Tabla 1). Las primeras evidencias de germinación fueron observadas en el tratamiento de escarificación por despuente apical (T3), la cual inició en la tercera semana para *P. ligularis* (7.1 %) y en la cuarta semana para *P. quimbayensis* (8.1 %).

En *P. quimbayensis* los mayores porcentajes acumulados de germinación se registraron entre las semanas 6 a 9, cuando alcanzaron un 46.5 %. En *P. ligularis* este mismo comportamiento fue evidente entre las semanas 5 a 9, con un porcentaje acumulado del 60.7 %, lo que sugiere una mayor velocidad de respuesta germinativa en esta última Passiflora.

El tratamiento T3 (escarificación por despuente apical) resultó ser el más eficiente para *P. quimbayensis*, con un 99 % de germinación, el cual mostró diferencias estadísticamente significativas respecto a los tratamientos T1 (sin escarificación) y T2 (escarificación total) (Tabla 1). En contraste, en *P. ligularis* los dos tratamientos que implicaron escarificación (T2 y T3) alcanzaron altos niveles de germinación (95 % y 100 %, respectivamente), sin diferencias significativas entre ellos, lo cual indica que cualquier método de escarificación física mejora considerablemente la respuesta germinativa de esta especie.

Por otro lado, el tratamiento T1 (sin escarificación) fue el menos eficiente en ambas especies, debido a que registró los porcentajes más bajos de germinación: 35.4 % para *P. quimbayensis* y 45.5 % para *P. ligularis*. Estos resultados respaldan la importancia de la escarificación como método pregerminativo en especies de Passiflora, especialmente en aquellas con testa dura e impermeable, donde la latencia exógena representa una barrera significativa para la emergencia radicular.

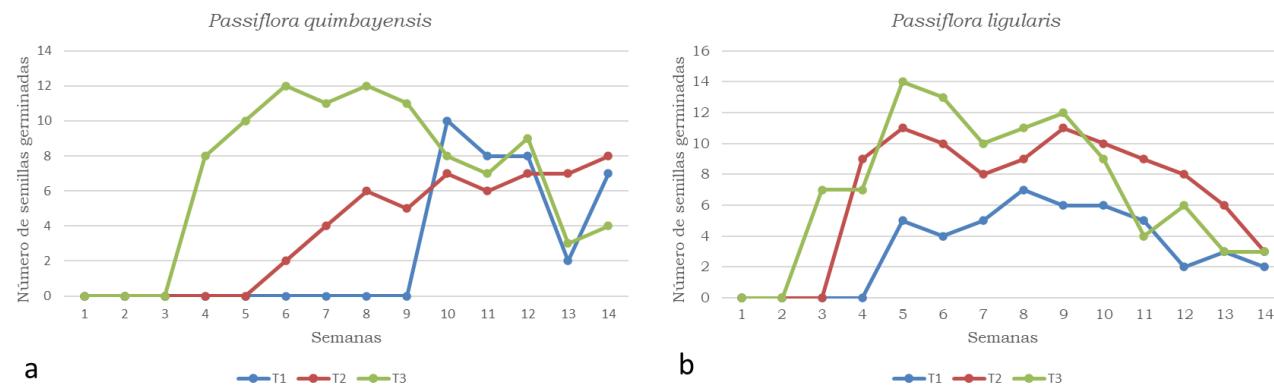


Figura 6. Evaluación de la germinación in vitro en las semillas de *P. quimbayensis* y *P. ligularis* bajo diferentes tratamientos.

Tabla 1. Germinación in vitro de semillas de *P. quimbayensis* y *P. ligularis* germinadas bajo diferentes tratamientos

Tratamientos	Repeticiones		Total semillas	Promedio semillas		Semillas
	1	2	3	germinadas	germinadas	germinadas (%)
Passiflora quimbayensis						
T1. Sin escarificación	10	10	15	35	11.6 a	35.4
T2. Escarificación total	20	18	15	53	17.7 b	53.5
T3. Escarificación en despuente apical	33	33	32	98	32.7 c	99.0
Passiflora ligularis						
T1. Sin escarificación	15	18	12	45	15.0 a	45.5
T2. Escarificación total	30	31	33	94	31.3 b	94.9
T3. Escarificación en despuente apical	33	33	33	99	33.0 b	100.0

*Las letras indican las diferencias de la prueba de comparación de medias de Tukey ($p \leq 0.05$) entre los diferentes tratamientos.

Los resultados obtenidos sugieren que la velocidad de imbibición del agua en las semillas de *Passiflora quimbayensis* y *Passiflora ligularis* influye directamente en la capacidad germinativa de los embriones, lo cual está estrechamente relacionado con las características estructurales y químicas de la testa. Esta observación concuerda con lo reportado por Taylorson y Hendricks (1977), quienes describieron que la impermeabilidad física de la cubierta seminal puede limitar la entrada de agua y, por tanto, retrasar o impedir la germinación en diversas especies de interés económico. Igualmente, en *P. tripartita* var. *mollissima*, Cardozo (1988) identificó que la testa está conformada por células fuertemente lignificadas y compactadas, lo que restringe la absorción de agua al canal micropilar. Este tipo de estructura anatómica representa una barrera física efectiva contra la imbibición, lo que condiciona significativamente el comportamiento germinativo. Adicionalmente, la testa de las semillas puede tener algunos inhibidores en su cubierta seminal, como la producción de ácido abscísico (ABA), lo cual puede inducir o mantener la latencia de la semilla, interfiriendo con la activación metabólica del embrión y el inicio de su desarrollo (Bewley y Black, 1982; Pérez et al., 2022).

En este contexto, la presencia de estructuras lignificadas y posibles reguladores negativos, como el ABA en la testa de *P. quimbayensis* podría explicar los bajos porcentajes de germinación observados en esta especie, a pesar de registrar una alta viabilidad embrionaria. Por el contrario, *P. ligularis*, con una testa aparentemente menos compacta, mostró una mayor respuesta germinativa, lo que sugiere diferencias interespecíficas en los mecanismos de control de la germinación.

El método de despuente apical (T3), aunque es un procedimiento más específico y lento, es la técnica más eficaz para obtener la mayor cantidad posible de plántulas en el menor tiempo. De acuerdo con Torres (2018), escarificar las semillas en las especies de *Passiflora* permite que el potencial hídrico de sus estructuras embrionarias aumente de manera significativa para que estas germinen. En concordancia, Gutiérrez et al. (2011) reportaron que la apertura controlada de la testa mediante despuente en *P. edulis* permitió superar las barreras físicas impuestas por la cubierta seminal, lo cual promueve una mejor absorción del ácido giberélico (AG_3) aplicado exógenamente y, en consecuencia, una germinación significativamente más eficiente.

Otros estudios demostraron que este método de escarificación parcial de la testa permitió obtener un mayor porcentaje de germinación *in vitro* en *P. gibertii* (Junghans et al., 2008; Carvalho et al., 2012). Así mismo, la aplicación de reguladores de crecimiento es favorable para la germinación de diferentes especies, debido a que aumenta el porcentaje de semillas en proceso de germinación (Hudson et al., 1997). En general, los resultados sugieren que el mejor tratamiento pregerminativo para las semillas de *P. quimbayensis* es la escarificación de despunte apical (T3), mientras que en *P. ligularis* cualquiera de los dos tratamientos que involucran la escarificación (T2 y T3) pueden ser recomendados para promover una germinación uniforme y eficiente en condiciones *in vitro*.

La formación de callos en *P. quimbayensis* fue evidente en la totalidad de las raíces evaluadas en los tratamientos T1 y T2; estos se observaron a partir de la octava semana posterior a la siembra y se extendieron hasta la décima semana. Los resultados sugieren que la aplicación de ácido giberélico (AG₃) como único regulador de crecimiento no fue suficiente para inhibir el proceso de callogénesis en las raíces de *P. quimbayensis*. Este comportamiento sugiere la necesidad de complementar el medio de cultivo con sustancias inhibidoras de la formación de callo, como la caseína hidrolizada (Roca y Mroginski, 1997).

Por otro lado, en la conservación *in vitro* es fundamental tener una alta frecuencia de regeneración de plantas a partir de diferentes explantes organizados, entre los cuales se encuentran meristemos, embriones, ejes embrionarios, etc., debido a que ofrecen la menor frecuencia de variación genética durante la conservación (Pacheco et al., 2016). Por el contrario, la formación de callo no organizado durante la fase de regeneración puede comprometer la integridad morfológica de la planta, al inducir procesos de desdiferenciación celular que llevan la aparición de variación somaclonal (Roca y Mroginski, 1997). Por tanto, el uso de explantes altamente diferenciados y la minimización de fases callogénicas constituyen elementos fundamentales para el establecimiento de protocolos eficientes de conservación *in vitro*, especialmente en especies con potencial agronómico o en riesgo de erosión genética (Roca y Mroginski, 1997; Mohammadi et al., 2023).

En conjunto, estos resultados demuestran que la escarificación mecánica mediante despunte apical es una estrategia eficaz para superar la latencia física en especies del género *Passiflora*, debido a que mejora significativamente los porcentajes de germinación *in vitro*. La implementación de esta técnica resulta particularmente relevante para especies silvestres con potencial agronómico o conservacionista, como *P. quimbayensis*, cuya germinación natural es limitada.

Etapa III. Estimulación y desarrollo de brotes axilares

En la fase de estimulación y desarrollo de brotes axilares, los explantes fueron transferidos a frascos con medio de cultivo MS libre de fitoreguladores con el fin de favorecer la organogénesis directa. *Passiflora ligularis* mostró una respuesta morfogénica positiva, evidenciada por la formación de brotes adventicios a partir de los explantes transferidos, lo cual representa una ventaja para protocolos de propagación *in vitro* sin recurrir al uso de fitoreguladores. En contraste, los explantes de *P. quimbayensis* no lograron desarrollar brotes adventicios durante el mismo periodo de evaluación. La ausencia de respuesta se asoció con la formación predominante de tejido calloso, lo que podría estar asociado a factores intrínsecos de la especie, como su grado de domesticación, la edad del tejido o su sensibilidad a las condiciones del medio de cultivo. Estos resultados coinciden con estudios previos en especies silvestres de *Passiflora*, en los que se ha reportado una menor capacidad de regeneración *in vitro* en comparación con especies cultivadas, debido a diferencias en su fisiología y requerimientos hormonales (Da Silva et al., 2021).

A diferencia de lo observado en el cultivo *in vitro*, al sembrar las semillas de *P. quimbayensis* bajo casa de malla se observó bajo porcentaje y baja velocidad de germinación. En *P. ligularis* el porcentaje de germinación estuvo en los picos más altos y mostró un tiempo de germinación igual al presentado en el cultivo *in vitro*. Estas diferencias pueden estar soportadas por las características ambientales particulares de los lugares donde estas especies están distribuidas, como la altura sobre el nivel del mar, la temperatura y la radiación solar. Aunque todas las especies estudiadas provienen de la región Andina entre 2000 y 3000 m, las preferencias climáticas son marcadas y el comportamiento de la germinación de la semilla puede variar.

Los resultados obtenidos en este estudio constituyen una base sólida y un complemento significativo para el desarrollo de futuras investigaciones enfocadas en la biología de semillas del género *Passiflora*, especialmente en el contexto de estrategias de conservación *in vitro*. Este enfoque cobra particular relevancia en especies que presentan algún grado de amenaza, dado su potencial para garantizar la preservación del germoplasma y la recuperación de poblaciones en riesgo.

El cultivo *in vitro* ha demostrado ser una herramienta eficiente para la propagación y conservación de *Passiflora*, con más de 62 especies reportadas con éxito en protocolos de micropropagación y regeneración de plántulas (Junghans et al., 2021; Castrillón et al., 2024). En el caso colombiano, en el que se presenta una alta diversidad y niveles significativos de endemismo en el género, la implementación de técnicas biotecnológicas se convierte en una prioridad dentro de los planes de conservación.

Es fundamental establecer e integrar estrategias tanto *in situ*, en áreas naturales protegidas, como *ex situ*, en jardines botánicos, bancos de germoplasma y colecciones de tejidos bajo condiciones controladas, incluyendo alternancias térmicas que promuevan la longevidad de las semillas (Caleño-Ruiz *et al.*, 2024; Junghans *et al.*, 2021). Estas acciones deben anticiparse a los efectos adversos del cambio climático y la deforestación, fenómenos que representan una amenaza directa a la viabilidad y permanencia de numerosas especies silvestres de *Passiflora*.

Conclusiones

La escarificación mecánica mediante despunte apical demostró ser el tratamiento más eficiente para superar la latencia física en *P. quimbayensis*, debido a que alcanzó porcentajes de germinación *in vitro* cercanos al 99 %. Este resultado confirma que la remoción parcial de la testa facilita la imbibición y promueve la activación fisiológica del embrión.

La evaluación de viabilidad mediante tinción con tetrazolio no constituye un predictor confiable del comportamiento germinativo, dado que la germinación está modulada por múltiples factores intrínsecos, como la latencia exógena, la composición físico-química de la testa y el grado de domesticación de la especie.

El cultivo *in vitro*, complementado con protocolos de asepsia eficientes y tratamientos de escarificación adecuados, permitió la regeneración de las semillas de *P. quimbayensis*, aunque en las raíces hubo formación de células no definidas y con callosidades, mientras que en *P. ligularis* el enraizamiento fue normal y sin presencia de callo.

Agradecimientos

Los autores agradecen a Dora Lilia Jaramillo auxiliar del laboratorio de Cultivo de Tejidos (Universidad Nacional de Colombia - Palmira) por su apoyo en la fase de propagación *in vitro*. Igualmente, al grupo de investigaciones en Recursos Fitogenéticos Neotropicales (GIRFIN-UNAL, proyecto Hermes 60162) por sus esfuerzos en la conservación de las especies nativas vegetales de Colombia.

Referencias

- Aguacía, L.; Miranda, D. y Carranza, C. (2015). Effect of fruit maturity stage and fermentation period on the germination of passion fruit (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Deg.) and sweet granadilla seeds (*Passiflora ligularis* Juss.). *Agronomía Colombiana*, 33(3), 305-314. <https://doi.org/10.15446/agron.colomb.v33n3.52460>
- Balaguera, H. E.; Álvarez, J. G. y Cárdenas, J. (2010). Efecto de la estratificación fría y la cobertura plástica en semillas de gulupa (*Passiflora edulis* Sims.) Para la obtención de plántulas. *Revista UDCA - Actualidad & Divulgación Científica*, 13(2), 8997. <https://doi.org/10.31910/rudca.v13.n2.2010.735>
- Bernal, C.; Duarte, L.; Bohórquez, M.; Johanna, E. y Constantino, J. (2018). Embriogénesis no zigótica en *Passiflora maliformis*. *Revista Peruana de Biología*, 25(3), 281-290.
- Bewley, J. y Black, M. (1982). Physiology and biochemistry of seeds in relations to germination. Vol. 2. Viability, dormancy and environmental control. Springer-Verlag. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-68643-6>
- Caleño-Ruiz, B. L.; Martínez-Peña, L. y Morales-Liscano, G. (2024). Influencia de la conservación *ex-situ* en el crecimiento de especies de *Passiflora* endémicas y amenazadas. *Biota Colombiana*, 25, e1213. <https://doi.org/10.21068/2539200X.1213>
- Cardozo, R. H. (1988). Efecto de la escarificación y la dosis del ácido giberélico (AG_3) en la germinación de semilla de curuba (*Passiflora mollissima*). *Acta Biológica Colombiana*, 1(4), 127-132. <https://revistas.unal.edu.co/index.php/actabiol/article/view/25526>
- Carvalho, M.; Paiva, R.; Porto, J.; Herrera, R.; Vargas, D. y Stein, V. (2012). *In vitro* germination of *Passiflora ligertii* N. E. Brown with mechanical scarification and gibberellic acid. *Semina Ciencias Agrarias*, 33, 1027-1032. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-68643-6>
- Castrillón, A. M.; Hernández, C. A.; González, E. P. y RestrepoBetancur, L. F. (2024). Estandarización de un protocolo de micropropagación de *Passiflora maliformis* L. (Passifloraceae) a partir de semillas y segmentos nódulos. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 26(2), 2132. <https://doi:10.15446/rev.colomb.biote.v26n2.115691>
- CerqueiraSilva, C. B. M.; Jesus, O. N.; Santos, E. S. L.; Corrêa, R. X. y Souza, A. P. (2014). Genetic Breeding and Diversity of the Genus *Passiflora*: Progress and Perspectives in Molecular and Genetic Studies. *International Journal of Molecular Sciences*, 15(8), 14122-14152. <https://doi.org/10.3390/ijms150814122>
- Córdoba, S.; Guzmán, J.; Pérez, B.; Zúñiga, P. y Pacheco, R. (2010). Propagación de especies nativas de la región Andina. https://www.researchgate.net/publication/316944015_Propagacion_de_Especies_Nativas_de_la_Region_Andina
- Costa, P. R.; De Oliveira, J. P. B.; De Araújo, A. G. A.; Lopes, J. C.; Schmildt, E. R.; Otoni, W. C. y Alexandre, R. S. (2016). Morphometry, *in vitro-ex vitro* germination and tetrazolium testing of stinking passionflower [*Passiflora foetida* var. *glaziovii* Killip] (Passifloraceae) seeds. *Australian Journal of Crop Science*, 10(8), 1075-1082. <https://doi.org/10.21475/ajcs.2016.10.08.p7175>
- Da Silva, A.; Hilst, P.; Fernandes, D. y Rogalski, M. (2019). Overcoming dormancy of *Passiflora elegans* Mast. (Passifloraceae) seeds. *Revista Verde de Agroecología e Desenvolvimento Sustentável*, 14(3), 406-411. <https://doi.org/10.18378/rvads.v14i3.6552>
- De Oliveira, R.; Da Silva, D. y Monzani, R. (2023). Avaliação da germinação das sementes de maracujá-amarelo (*Passiflora edulis*) submetida a diferentes métodos de superação de dormência. *Agropecuária Catarinense*, Florianópolis, 36(3), 26-28. <https://doi.org/10.52945/rac.v36i3.1720>
- Delanoy, M.; Van Damme, P.; Scheldeman, X. y Beltran, J. (2006). Germination of *Passiflora mollissima* (Kunth) L.H. Bailey, *Passiflora tricuspis* Mast. and *Passiflora* nov. sp. seeds. *Scientia Horticulturae*, 110(2), 198-203. <https://doi.org/10.1016/j.scientia.2006.07.007>
- Ellis, R.; Hong, T. y Roberts, E. (1985). *Handbook of seed technology for genebanks*. (Vol. II). Compendium of specific germination. Information

- and test recommendations. International Board for Plant Genetic Resources (IBPGR). <https://hdl.handle.net/10568/105406>
- Faleiro, F. G.; Junqueira, N. T. V.; Junghans, T. G.; De Jesus, O. N.; Miranda, D. y Otoni, W. C. (2019). Advances in passion fruit (*Passiflora* spp.) propagation. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 41(2), e-155. <https://doi.org/10.1590/0100-29452019155>
- Gonzales, C. (2004). propagación in vitro de especies nativas con potencial agroalimentario pertenecientes a las familias Passifloraceae y Solanaceae. Informe técnico. Bogotá: Jardín Botánico José Celestino Mutis, Subdirección Científica.
- Gutiérrez M.; Miranda D. y Cárdenas, J. (2011). Efecto de tratamientos pregerminativos sobre la germinación de semillas de gulupa (*Passiflora edulis* Sims.), granadilla (*Passiflora ligularis* Juss.) y cholupa (*Passiflora maliformis* L.). *Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas*, 5(2), 209-219. http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2011-21732011000200005&lng=es&tlang=es
- Hong, T. D. y Ellis, R. H. (1996). A Protocol to Determine Seed Storage Behaviour. Technical Bulletin No. 1. Rome: International Plant Genetic Resources Institute.
- Hudson, T. y Dale, L. (1997). Fredsand. Principles of tissue culture for micropropagation. En *Plant propagation* (pp. 549-589). Prentice Hall
- Júnior, D.; São José, A.; Rebouças, H.; Morais, M. y Dourado, N. (2010). Superação de dormência de maracujá-do-mato (*Passiflora cincinnata* Mast.). *Revista Brasileira de Fruticultura*, 32(2), 584-590. <https://doi.org/10.1590/S0100-29452010005000045>
- Junghans, T.; Viana, A. y Junghans, T. (2008). Remoção parcial do tegumento na germinação in vitro e ex vitro de sementes de *Passiflora gibertii* N. E. Brown. *Magistra, Cruz das Almas-BA*, 20(3), 231-235.
- Junghans, T.; Jesus, O.; Silva, J. y Ferreira, M. (2021). In vitro storage of sweet passion fruit seeds as an innovation conservation alternative. *Anais Da Academia Brasileira de Ciências*, 93(3). <https://doi.org/10.1590/0001-3765202120190901>
- Lima, M.; Betemps, L.; Tomaz, P.; Galarça, P. y Rufato, R. (2009). Germinação de sementes e crescimento de maracujá em diferentes concentrações do ácido giberélico, tempos de imersão e condições experimentais. *Current Agricultural Science and Technology*, 15, 1-4. <https://periodicos.ufpel.edu.br/index.php/CAST/article/view/1985>
- Manjarrés, E. y Perea, M. (2012). Establishment of a purple passion fruit (*Passiflora edulis* Sims.) propagation protocol from zygotic embryos and axillary shoots. *Agronomía*, 20(2), 53-64.
- Mendiondo, G. y Amela García, M. (2009). Germination of stored and scarified seeds of *Passiflora caerulea* L. (Passifloraceae). *Plant Biosystems*, 143(2), 369-376. <https://doi.org/10.1080/11263500902722709>
- Miller, A. L. y Peters, J. (2010). *Tetrazolium Testing Handbook*. Association of Official Seed Analysts (AOSA) / Society of Commercial Seed Technologists (SCST).
- Mohammadi, M. A.; Wai, M. H.; Rizwan, H. M.; Qarluq, A. Q.; Xu, M.; Wang, L.; Cheng, Y.; Aslam, M.; Zheng, P.; Wang, X.; Zhang, W. y Qin, Y. (2023). Advances in micropropagation, somatic embryogenesis, somatic hybridizations, genetic transformation and cryopreservation for *Passiflora* improvement. *Plant Methods*, 19(50), 1-15. <https://doi.org/10.1186/s13007-023-01030-0>
- Ocampo, J.; Hurtado, A. y López, W. R. (2021). Chapter 1: Genetic resources and breeding prospects in *Passiflora* species. En A. Hurtado Salazar, J. Ocampo, N. Ceballos-Aguirre, D. J. García Jaramillo y W. R. López (eds.), *Passiflora: genetic, grafting and biotechnology approaches* (pp. 1-76). Nova Science Publisher.
- Pacheco, G.; Simão, M. J.; Vianna, M. G.; Garcia, R. O.; Vieira, M. L. C. y Mansur, E. (2016). In vitro conservation of *Passiflora*. A review. *Scientia Horticulturae*, 211, 305-311. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2016.09.004>
- Passos, I.; Matos, G.; Meletti, L.; Scott, M.; Bernacci, L. y Vieira, M. (2004). Utilização do ácido giberélico para a quebra de dormência de sementes de *Passiflora nitida* Kunth germinadas in vitro. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 26(2), 380-381. <https://doi.org/10.1590/S0100-29452004000200051>
- Pérez, V. M.; Scandaliaris, M.; Arias, C. V. y Perissé, P. (2022). Caracterización morfo-anatómica de semillas y plántulas de *Passiflora caerulea*, *P. mooreana* y *P. morifolia* (Passifloraceae). *Lilloa*, 59(2), 1-15. <https://doi.org/10.30550/j.lil/2022.59.2/2022.10.31>
- Posada, P.; Ocampo, J. y Santos, L. G. (2014). Estudio del comportamiento fisiológico de la semilla de tres especies cultivadas de *Passiflora* L. (Passifloraceae) como una contribución para la conservación ex situ. *Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas*, 8(1), 9-19. http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2011-21732014000100002
- Roca, W. y Mroginski, L. (1997). Cultivo de tejidos en la agricultura, fundamentos y aplicaciones. CIAT, Centro Internacional de Agricultura Tropical. <https://cgspace.cgiar.org/handle/10568/53954>
- Rodríguez, N.; Melgarejo, L. M. y Blair, M. W. (2020). Seed structural variability and germination capacity in *Passiflora edulis* Sims f. *edulis*. *Frontiers in Plant Science*, 11, 498. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00498>
- Severin, C.; Salinas, A.; Gattusso, S.; Gattusso, M.; Busilacchi, H.; Giubileo, G. y Aguirre, A. (2004). Estimulación de la germinación de semillas de *Passiflora caerulea* cultivadas in vitro. *Revista de la Facultad de Ciencias Agrarias - UNR*, 4(4): 55-58.
- Taylor, C.; Salinas, A.; Gattusso, S.; Gattusso, M.; Busilacchi, H.; Giubileo, G. y Aguirre, A. (2004). Estimulación de la germinación de semillas de *Passiflora caerulea* cultivadas in vitro. *Revista de la Facultad de Ciencias Agrarias*, 4(6), 55-58. <https://rephip.unr.edu.ar/items/aeff0e5a-56c8-4e81-87b6-a6df07392188>
- Taylorson, R. y Hendricks, S. (1977). Dormancy in seeds. *Annual Review of Plant Biology*, 28, 331-354. <https://doi.org/10.1146/annurev.pp.28.060177.001555>
- Torres, A. M. (2018). Seed dormancy and germination of two cultivated species of Passifloraceae. *Boletín Científico Centro de Museos Museo de Historia Natural*, 22(1), 15-27. <https://doi.org/10.17151/bccm.2018.22.1.1>
- Vega, E.; Campos, V.; Monge, A.; Bertsch, S. y Vargas, E. (2022). Morphology and viability test optimization in seeds of *Passiflora* spp. from Costa Rica. *Agronomía Mesoamericana*, 33, 51567. <https://doi.org/10.15517/am.v33iEspecial.51567>